

Bibliographic Fields

Document Identity

(19)【発行国】

日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】

特許公報(B2)

(11)【特許番号】

第2830107号

(45)【発行日】

平成10年(1998)12月2日

(43)【公開日】

平成3年(1991)3月6日

Filing

(24)【登録日】

平成10年(1998)9月25日

(21)【出願番号】

特願平1-185397

(22)【出願日】

平成1年(1989)7月18日

【審査請求日】

平成8年(1996)1月26日

Public Availability

(45)【発行日】

平成10年(1998)12月2日

(43)【公開日】

平成3年(1991)3月6日

Technical

(54)【発明の名称】

陰イオン交換樹脂

(51)【国際特許分類第6版】

B01J 41/14

C08G 81/02

G01N 30/48

【FI】

B01J 41/14 Z

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Japanese Patent Publication (B2)

(11) [Patent Number]

28 th 30107 numbers

(45) [Issue Date]

1998 (1998) December 2 days

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1991 (1991) March 6 days

(24) [Registration Date]

1998 (1998) September 25 days

(21) [Application Number]

Japan Patent Application Hei 1 - 185397

(22) [Application Date]

1989 (1989) July 18 days

{Request for Examination day}

1996 (1996) January 26 days

(45) [Issue Date]

1998 (1998) December 2 days

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1991 (1991) March 6 days

(54) [Title of Invention]

ANIONIC EXCHANGE RESIN

(51) [International Patent Classification, 6th Edition]

B01J 41/14

C08G 81/02

G01N 30/48

[FI]

B01J 41/14 Z

JP2830107B2

1998-12-2

C08G 81/02

C08G 81/02

G01N 30/48 P

G01N 30/48 P

【請求項の数】

[Number of Claims]

1

1

【全頁数】

[Number of Pages in Document]

6

6

(56)【参考文献】

(56) [Cited Reference(s)]

【文献】

[Literature]

特開 昭58-223062(JP, A)

Japan Unexamined Patent Publication Sho 58 - 223062
(JP,A)

【文献】

[Literature]

特開 昭62-259061(JP, A)

Japan Unexamined Patent Publication Sho 62 - 259061
(JP,A)

【文献】

[Literature]

特公 平7-18846(JP, B2)

Japan Examined Patent Publication Hei 7 - 18846 (JP,B2)

(58)【調査した分野】

(58) [Field of Search]

(Int. Cl. 6, DB 名) B01J 41/00G01N
30/48C08G 81/02

(International Class 6,DB name) B01J 41/00G01N
30/48C08G 81/02

(65)【公開番号】

(65) [Publication Number of Unexamined Application (A)]

特開平3-52648

Japan Unexamined Patent Publication Hei 3 - 52648

Parties

Assignees

(73)【特許権者】

(73) [Patent Rights Holder]

【識別番号】

[Identification Number]

999999999

999999999

【氏名又は名称】

[Name]

横河電機株式会社

**YOKOGAWA ELECTRIC CORPORATION (DB
69-053-6891)**

【住所又は居所】

[Address]

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号

Tokyo Prefecture Musashino City Nakamachi 2-9-32

Inventors

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】

[Name]

井上 嘉則

Inoue Yoshinori

【住所又は居所】

[Address]

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電
機株式会社内

Inside of Tokyo Prefecture Musashino City Nakamachi
2-9-32 Yokogawa Electric Corporation (DB 69-053-6891)

(72)【発明者】

【氏名】

熊谷 浩樹

【住所又は居所】

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内

Agents

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】

東野 博文

【審査官】

関 美祝

Claims

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質が共存している水溶液中の陰イオンを分離、定量する球状体の陰イオン交換樹脂において、

前記球状体は、

表面に結合されていて、前記タンパク質が帯電する電荷に反発する負の電荷を有するポリマーと、

構造のいたるところにあって、前記タンパク質の分子径より小さな径の微細孔と、

この微細孔の内部表面に結合されていて、前記微細孔に入った前記陰イオンをイオン交換する陰イオン交換基と、

を具備し、前記タンパク質が負電荷を有する pH 領域で前記陰イオンを定量分析することを特徴とした陰イオン交換樹脂。

Specification

【発明の詳細な説明】

本発明は、クロマト管に充填されタンパク質が共存している試料中の陰イオンを液体クロマトグラフィー手法(イオンクロマトグラフィー手法も含む)を用いて定量分析するのに用いて好適な陰イオン交換樹脂(充填剤)に関する。

(72) [Inventor]

[Name]

Kumagaya Hiroki

[Address]

Inside of Tokyo Prefecture Musashino City Nakamachi
2-9-32 Yokogawa Electric Corporation (DB 69-053-6891)

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name]

Higashino Hirofumi

[Examiner]

Seki Miho

(57)[Claim(s)]

[Claim 1]

To separate anion in aqueous solution where protein has coexisted, in anionic exchange resin of sphere which quantification is done,

As for aforementioned sphere,

Being connected by surface, aforementioned protein static charge in electric charge which is done repulsion polymer which possesses negative electric charge which is done and,

There being structure reaches, micropore of smaller diameter than the molecular diameter of aforementioned protein and,

Being connected by internal surface of this micropore, anion exchange group which the aforementioned anion which enters into aforementioned micropore the ion exchange is done and,

anionic exchange resin. where it possesses, quantitative analysis does aforementioned anion with pH domain where aforementioned protein has negative charge and makes feature

[Description of the Invention]

<Industrial Area of Application> this invention is filled in chromatography column and anion in sample where the protein has coexisted using in order quantitative analysis to do making use of the liquid chromatography technique (Also ion chromatography technique includes.), regards preferred anionic exchange resin (filler).

一般に、タンパク質が共存している試料中の陰イオンを液体クロマトグラフィー手法(イオンクロマトグラフィー手法も含む)を用いて定量分析すると次のような問題が生じていた。

即ち、分離カラム内に充填された陰イオン交換樹脂の表面若しくはイオン交換基に試料中のタンパク質などが吸着し、みかけ上のイオン交換容量が低下して陰イオンの分離性能が低下したり定量性が低下することが多かった。

また、このようにして吸着したタンパク質が蓄積することにより上記分離カラムの圧力が上昇することも多く、このような圧力上昇が生ずると上記分離カラムの再生は実際上不可能となっていた。

このような問題を解決する方法としては、試料からあらかじめタンパク質を除去する方法、上記分離カラムを頻繁に洗浄して吸着したタンパク質を除去する方法、及びタンパク質を吸着するプレカラムを備えた切換弁を分離カラムの前に設置してタンパク質を除去する方法などが行なわれていた。

然しながら、試料からあらかじめタンパク質を除去する方法の場合、第 1 に試料の前処理に時間がかかること、第 2 の除タンパク剤が測定対象イオンの分離に悪影響を及ぼす可能性があること、第 3 に沈澱などで除去されるタンパク質の中に目的成分が取りこまれてしまうことなどの欠点があった。

また、分離カラムを頻繁に洗浄して吸着したタンパク質を除去する方法の場合は、第 1 に分析を一旦停止しカラムに移動相と異なる溶媒を流さなければならず、分析の連続性を維持したりメンテナンスの効率確保などの面から好ましいことではないこと、第 2 に一旦吸着したタンパク質は簡単に洗い流すことができず結果的にカラムの消耗が早いという欠点があった。

タンパク質を吸着するプレカラムを分離カラムの前に設置してタンパク質を除去する方法は、上述のような欠点がなく現在では最も優れた方法であるが、装置が複雑なうえプレカラム(吸着カラム)のメンテナンスが必要となるという新たな欠点があった。

本発明は、かかる状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、クロマト管に充填されタンパ

<Prior Art>

When generally, anion in sample where protein has coexisted quantitative analysis is done making use of liquid chromatography technique (Also ion chromatography technique includes.), next kind of problem occurred.

Namely, surface of anionic exchange resin which is filled inside separation column or the protein etc in sample adsorb into ion exchange group, happen to see and the ion exchange capacity above decreases and separation performance of anion decreases and/or the quantitative behavior decreases was many.

In addition, when there is many also fact that pressure of the above-mentioned separation column rises this way adsorbs due to fact that the protein which accumulates, this kind of pressure rise occurs, regeneration of the above-mentioned separation column had become upper impossible really.

Washing method, above-mentioned separation column which beforehand removes the protein from sample as method which solves this kind of problem, in frequent, method, which removes protein which adsorbs and installing changeover valve which has pre column which adsorbs before the separation column, method etc which removes protein were done protein.

<Problem That Invention Seeks to Solve>

But, in case of method which beforehand removes protein from the sample, time is required for pretreatment of sample in first, there was a thing or other deficiency which objective component is taken in in protein which is possibility where second protein removal agent causes adverse effect to separation of measurement subject ion, is removed to third with precipitation etc.

In addition, washing separation column in frequent, in case of method which removes protein which adsorbs, it stops analysis once in the first and it must let flow solvent which differs from transfer phase in column, it is not to maintain continuity of analysis and/or to be desirable from efficiency guaranty or other aspect of maintenance, You wash away protein which adsorbs into second once simply it is not possible and there was a deficiency that consumption of the column is quick in resulting.

protein installing pre column which adsorbs before separation column, the method which removes protein is not a deficiency an above-mentioned way and presently it is a method which most is superior, but there was a new deficiency that equipment maintenance of pre column (adsorption column) on complex becomes necessary.

As for this invention, considering to this condition, being something which it is possible, objective is filled in

物質が共存している試料中の陰イオンを液体クロマトグラフィー手法(イオンクロマトグラフィー手法も含む)を用いて定量分析するのに用いて好適な陰イオン交換樹脂を提供することにある。

このような目的を達成するために、本発明は、

タンパク質が共存している水溶液中の陰イオンを分離、定量する球状体の陰イオン交換樹脂において、

前記球状体は、

表面に結合されていて、前記タンパク質が帯電する電荷に反発する負の電荷を有するポリマーと、

構造のいたるところにあって、前記タンパク質の分子径より小さな径の微細孔と、

この微細孔の内部表面に結合されていて、前記微細孔に入った前記陰イオンをイオン交換する陰イオン交換基と、

を具備し、前記タンパク質が負電荷を有する pH 領域で前記陰イオンを定量分析することを特徴としている。

以下、本発明について図を用いて詳細に説明する。

第 1 図は、本発明の陰イオン交換樹脂の構成図で、一部を拡大して示したものである。

陰イオン交換樹脂は、球状体をしていて、その表面には pH 値が約 10 のとき弱い負電荷を有しているポリマー B (例えば、カルボキシル基など) が多数結合している。

また、陰イオン交換樹脂 A の表面の一部には微細孔(図中では、楔状に示した部分、以下、細孔 D という)があり、この細孔 D には陰イオン交換基 C が多数結合している。

このような構造の陰イオン交換樹脂において、試料中のタンパク質 P は分子半径が大きいため細孔 D に入れず、しかも負の電荷を有しているため上記ポリマー B によってイオン排除される。

また、試料中の陰イオン S⁻ は細孔 D 内の陰イオン交換基 C と陰イオン交換し、試料中の陽イオン S⁺ は上記ポリマー B と極めて弱い陽イオン交

chromatography column and anion in the sample where protein has coexisted using in order quantitative analysis to domaking use of liquid chromatography technique (Also ion chromatography technique includes.), it is to offer preferred anionic exchange resin.

<Means to Solve the Problems>

In order to achieve this kind of objective, as for this invention,

To separate anion in aqueous solution where protein has coexisted, in anionic exchange resin of sphere which quantification is done,

As for aforementioned sphere,

Being connected by surface, aforementioned protein static charge in electric charge which is done repulsion polymer which possesses negative electric charge which is done and,

There being structure reaches, micropore of smaller diameter than the molecular diameter of aforementioned protein and,

Being connected by internal surface of this micropore, anion exchange group which the aforementioned anion which enters into aforementioned micropore the ion exchange is done and,

It possesses, quantitative analysis it does aforementioned anion with the pH domain where aforementioned protein has negative charge, it has made feature.

<Working Example>

Below, concerning this invention you explain in detail making use of the figure.

Figure 1, with configuration diagram of anionic exchange resin of this invention, expanding part, is something which it shows.

Doing sphere, when pH value approximately 10 being in surface, polymer B (for example carboxyl group etc) which has possessed weak negative charge large number has connected anionic exchange resin.

In addition, there is a micropore (With in the diagram, below portion, which is shown in wedge, you call capillary D) in portion of surface of anionic exchange resin A, anion exchange group C large number has connected to this capillary D.

In anionic exchange resin of this kind of structure, protein P in sample because the molecule radius is large, furthermore because it has possessed negative electric charge, not to insert in capillary D, ion is removed with above-mentioned polymer B.

In addition, anion exchange group C and anion exchange inside capillary D it does the anion S⁻ in sample, cation S⁺ in sample above-mentioned polymer B quite has reached point

換するようになっている。

図 2 は、本発明に係わる陰イオン交換樹脂の製造方法を説明するための工程説明図である。

この図において、最初、反応方法に合わせて一定の官能基をもつ高分子ゲルを用意するか反応方法に合わせて一定の官能基を導入した樹脂を作る。

これは、基材となるものである。

例示するならば、エポキシ基が $350 \mu\text{mol/g}$ 導入された粒子径 $12 \mu\text{m}$ のヒドロキシアリルメタクリレート系架橋高分子ゲルなどが挙げられる。

次に、上記高分子ゲルを負電荷をもつ合成高分子物質が固定化されやすい緩衝液中に分散させる。

例示するならば、上記ヒドロキシアリルメタクリレート系架橋高分子ゲルの 5g (乾燥重量) を、 1% の 2-ヒドロキシメタクリレート・メタクリル酸 (メタクリル酸の含量; 重量比 20%) コポリマー水溶液中に分散させ、 45% ホウフッ化亜鉛水溶液 0.05g を加えて、 50 deg C のインキュベータ中で 6 時間反応させた。

反応後、上記樹脂を純水で十分洗浄した後、イオン交換基となる化合物を混合し、一定温度の下で一定時間反応させる。

例示するならば、 10% のトリメチルアミン溶液中に分散させ、 30 deg C で 10 時間反応させ、反応終了後、樹脂を純水で十分に洗浄する。

その後、 0.1M 硫酸水溶液中に分散させ、 30 deg C で 2 時間反応させる。

次に、反応によって生じた樹脂を緩衝液で洗浄してのち十分に水洗し、その後、目的の対イオンに交換する。

例示するならば、反応によって生じた樹脂を 100ml の純水で十分に洗浄し、その後、 0.5M の塩化ナトリウム水溶液中に分散させ濾過し、更に、 0.5M の塩化ナトリウム水溶液 50ml で洗浄した後、純水で十分に洗浄し、 0.1M の塩化ナトリウム水溶液中に分散し 1 晩放置する。

例示したようにして得られた陰イオン交換樹脂は、 $45 \mu\text{Eq/ml}$ のイオン交換容量を持っていた。

また、この陰イオン交換樹脂は、例えば、内径 5.0mm 、長さ 100mm のステンレス製クロマト管

where weak cation exchange it does.

Figure 2 is step explanatory diagram in order to explain manufacturing method of anionic exchange resin which relates to this invention.

In this figure, first, adjusting to reaction method, you prepare polymer gel which has fixed functional group adjusting to reaction method, you make resin which introduces fixed functional group.

This is something which becomes substrate.

If it illustrates is, $350 \mu\text{mol/g}$ hydroxyalkyl methacrylate crosslinked polymer gel etc of particle diameter $12 \mu\text{m}$ which is introduced you can list epoxy group.

Next, above-mentioned polymer gel is dispersed in buffer which the synthetic polymeric substance which has negative charge is easy to be fixed.

If it illustrates is, dispersing 5 g (dried weight) of above-mentioned hydroxyalkyl methacrylate crosslinked polymer gel, in 1% 2-hydroxy methacrylate * methacrylic acid (content; weight ratio 20% of methacrylic acid) copolymer aqueous solution, 6 -hour reaction it did in incubator of 50 deg C including 45% zinc borofluoride aqueous solution 0.05g .

After reacting, above-mentioned resin fully after washing with pure water, it mixes compound which becomes ion exchange group constant time reacts under constant temperature.

If it illustrates is, dispersing in 10% trimethyl amine solution, 10 hours reacting with 30 deg C , after reaction termination, with pure water you wash the resin in fully.

After that, dispersing in 0.1 M sulfuric acid water solutions, 2 hours it reacts with 30 deg C .

Next, washing resin which it occurs with reaction with buffer, water wash it does in rear satisfactory, after that, exchanges to the counterion of objective.

If it illustrates is, with pure water of 100 ml you wash resin which it occurs with reaction in satisfactory, after that, disperse in sodium chloride aqueous solution of 0.5 M and filter, furthermore, after washing with the sodium chloride aqueous solution 50 ml of 0.5 M , with pure water you wash in satisfactory, disperse in sodium chloride aqueous solution of 0.1 M and overnight leave.

As illustrated, anionic exchange resin which it acquires had ion exchange capacity of $45 \mu\text{Eq/ml}$.

In addition, this anionic exchange resin in stainless steel chromatography column of for example internal diameter 5.0

に高圧スラリー充填法を用いて充填し、イオンクロマトグラフや液体クロマトグラフ用分離カラム等として使用される。

ところで、上記基材としては、比較的親水性の多孔性架橋高分子ゲルでその表面に負電荷をもつ合成高分子物質が供給できるような官能基を有しているか、その表面に負電荷をもつ合成高分子物質が結合できるような官能基を導入できる樹脂でなければならない。

また、負電荷をもつ合成高分子物質が、基材と結合を形成する反応性の官能基例えばエポキシ基などをもっているのも良い。

更に、このような樹脂の持つ細孔は、表面に結合する負電荷をもつ合成高分子物質あるいは試料中に存在するタンパク質などが浸透できないか若しくは僅かしか浸透できない程度に小さくなければならない。

具体的には、下記(イ)又は(ロ)のような樹脂が望ましい。

(イ)カルボキシル基、アミノ基、水酸基、又はエポキシ基などを有するポリメタクリレート樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、若しくはポリエーテル樹脂など。

(ロ)ハロゲン基または水酸基を有し、且つ、上記官能基および負電荷をもつ合成高分子物質が化学的に結合できる官能基の導入が可能なポリメタクリレート樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、若しくはポリエーテル樹脂など。

また、負電荷をもつ合成高分子物質は、前記基材の官能基と反応し且つ基材の細孔内部には浸透できないような分子量をもつものでなければならない。

負電荷をもつ合成高分子物質は、その高分子鎖中に使用する移動相中で電荷をもたない親水性基(例えば水酸基)を十分に有し同時に負電荷をもつ基(例えばカルボキシル基、スルホン基など)を部分的に有していなければならない。

このとき、その高分子鎖中において親水性基と負電荷をもつ基とのモル率は、負電荷をもつ基について 0.05~0.5、好ましくは 0.1~0.3 でなければならない。

このような合成高分子の例として、2-ヒドロキシエチルメタクリレート-メタクリル酸コポリマーなど

mm、length 100 mm is filled making use of high pressure slurry filling method, is used as ion chromatograph and separation column etc for liquid chromatograph.

By way, relatively it has possessed functional group which can supply the synthetic polymeric substance which with hydrophilic porosity crosslinked polymer gel has negative charge in surface as the above-mentioned substrate, it must be a resin which can introduce the functional group which can connect synthetic polymeric substance which has negative charge in surface.

In addition, synthetic polymeric substance which has negative charge, is good having substrate and functional group for example epoxy group etc of reactivity which forms connection.

Furthermore, protein etc which exists in synthetic polymeric substance or sample which has negative charge which is connected to surface cannot permeate capillary which this kind of resin has, or or barely only, small to extent which it cannot permeate does not become.

Concretely, description below (J2) or resin like (jp2) is desirable.

(J2) carboxyl group, amino group, hydroxy group, or polymethacrylate resin, polyvinyl alcohol resin, or polyether resin etc which possesses epoxy group etc.

polymethacrylate resin, polyvinyl alcohol resin, or polyether resin etc whose introduction of functional group which possesses (jp2) halogen group or hydroxy group, at same time, can connect to chemical above-mentioned functional group and synthetic polymeric substance which has negative charge is possible.

In addition, as for synthetic polymeric substance which has negative charge, only functional group and reaction of aforementioned substrate in capillary internal of substrate, it must be something which has kind of molecular weight which it cannot permeate.

synthetic polymeric substance which has negative charge, it possesses hydrophilic group (for example hydroxy group) which does not have electric charge in transfer phase which is used in polymer chain in the fully and basic (for example carboxyl group, sulfone group etc) which has negative charge simultaneously partially it has had to have possessed.

This time, in in polymer chain mole ratio of hydrophilic group and basis which has negative charge, 0.05 - 0.5, must be preferably 0.1~0.3 concerning the basis which has negative charge.

As example of this kind of synthetic polymer, you can list 2-hydroxyethyl methacrylate-methacrylic acid copolymer etc.

が挙げられる。

この場合、2-ヒドロキシエチルメタクリレートの水酸基が親水性基であり、同時に基材と反応する官能基となっている。

また、親水性基の代わりに合成高分子を基材表面に結合後、化学処理によって親水性基に交換できる官能基(例えばエポキシ基など)を有していても良い。

このとき、その高分子鎖中において親水性基と負電荷をもつ基とのモル分率は、負電荷をもつ基について 0.05~0.7、好ましくは 0.1~0.5 でなければならない。

このような合成高分子の例として、2-ヒドロキシエチルメタクリレート-メタクリル酸コポリマーなどが挙げられる。

基材細孔内部のイオン交換基は、基材細孔内部に充分浸透できるような低分子物質で、負電荷をもつ合成高分子物質と未反応の細孔内部官能基(必ずしも負電荷をもつ合成高分子物質を結合させた官能基と同じでなくとも良い)と反応して陰イオン交換基となる物質でなければならない。

具体的には一般的なアルキルミン類、エタノールアミンなどのアルカノールアミン類、アジミン類、ヒドロキシアリルアンモニウムなどが該当する。

第3図は一般的なサブレスト型イオンクロマトグラフ装置の構成説明図であり、送液ポンプ2aが駆動すると、溶離液槽1a内の溶離液が、送液ポンプ2a→インジェクタ3→分離カラム4→サブレッサ5の内室5c→検出器6を経由し、廃液槽7aへと流れる。

また、送液ポンプ2bが駆動すると、除去液槽1b内の除去液が、送液ポンプ2b→サブレッサ5の外室5bを経由し、廃液槽7bへと流れる。

このため、サブレッサ5の内室5cに存在する陽イオンが陽イオン交換膜5aを介してサブレッサ5の外室5bとイオン交換するようになり、結果的にサブレッサ5の内室5cに存在する流体の導電率バックグラウンドが除去される。

尚、分離カラム4、サブレッサ5、および検出器6は、恒温槽9内に収納されて一定温度(例えば40 deg C)に保たれると共に、送液ポンプ2、イン

-hydroxyethyl methacrylate-methacrylic acid copolymer etc.

In this case, 2-hydroxyethyl methacrylate hydroxy group being hydrophilic group, it has become the functional group which reacts with substrate simultaneously.

In place of hydrophilic group synthetic polymer after connecting, it is good to the substrate surface having possessed functional group (for example epoxy group etc) which can be exchanged to the hydrophilic group with chemical treatment.

This time, in in polymer chain molar proportion of hydrophilic group and basis which has negative charge, 0.05 - 0.7, must be preferably 0.1~0.5 concerning basis which has negative charge.

As example of this kind of synthetic polymer, you can list 2-hydroxyethyl methacrylate-methacrylic acid copolymer etc.

ion exchange group of substrate capillary internal, satisfactory with low molecular weight charge substance which it can permeate, synthetic polymeric substance and unreacted capillary internal functional group which have negative charge (Always not being same as functional group which connects synthetic polymeric substance which has negative charge also it is good.) with reacting in substrate capillary internal, must be substance which becomes anion exchange group.

general alkyl ミン, ethanolamine or other alkanolamine, horse mackerel ミン and hydroxyalkyl ammonium etc correspond concretely.

As for Figure 3 when with constitution explanatory diagram of general サ press To type ion chromatograph equipment, transport pump 2a drives, eluting liquid inside dissolved liquid tank 1a, via inner chamber 5c→detector 6 of transport pump 2a→injector 3→separation column 4→suppressor 5, flows to with waste liquid tank 7a.

In addition, when transport pump 2b drives, removed liquid inside removed liquid tank 1b, via outside room 5b of transport pump 2b→suppressor 5, flows to with the waste liquid tank 7b.

Because of this, cation which exists in inner chamber 5c of suppressor 5 through cation exchange membrane 5a, outside room 5b and it reaches point where ion exchange of suppressor 5 it does, electrical conductivity background of fluid which in resulting exists in inner-chamber 5c of suppressor 5 is removed.

Furthermore as for separation column 4, suppressor 5, and detector 6, being stored up inside the constant temperature tank 9, as it is maintained at constant temperature (for

ジェクタ 3、分離カラム 4、サプレッサ 5、および検出器 6 が分析装置の筐体 10 に収納されていることが多い。

このような構成からなるイオンクロマトグラフ装置において、インジェクタ 3 に一定量注入された試料に含まれている陰イオンは、分離カラム 4 で分離され、その後、サプレッサ 5 で上述のようにして導電率のバックグラウンドが除去されてのち検出器 6 で検出される。

このようにして検出器 6 で検出された信号は、表示装置 8 (例えば記録計) に導かれクロマトグラムを描くようになっている。

前述のようにして製造した陰イオン交換樹脂を分離カラム 4 内に充填すると共に次のような実験条件で後述の試料を回収したり分析したりしたところ次のような実験結果が得られた。

即ち、

(イ) 陰イオン交換樹脂を、内径 5.0mm、長さ 100mm のステンレス製クロマト管に高圧スラリー充填法を用いて充填し、リン酸緩衝液中でタンパク質の回収率を測定したところ、約 95% (アルブミン) であった。

また、4.0mM Na_2CO_3 /4.0mM NaHCO_3 (pH は 10.0) での回収率は約 88% であった。

(ロ) 4.0mM Na_2CO_3 /4.0mM NaHCO_3 (pH は 10.0) の移動相を使用 (流量は 2.0ml/min.) し、恒温槽 9 の温度 40 deg C、試料注入量 50 μl 、検出器 6 の種類は紫外吸収検出器とし、 Cl^- イオン、 NO_2^- イオン、 Br^- イオン、 NO_3^- イオン、 SO_4^{2-} イオンを良好に分離できた。

(ハ) 上記 (ロ) と同一条件下で、0.2% のアルブミンを含む試料の測定を行ったが、この場合も、 Cl^- イオン、 NO_2^- イオン、 Br^- イオン、 NO_3^- イオン、 SO_4^{2-} イオンを良好に分離できた。

以上のことから、本発明の陰イオン交換樹脂を用いれば、タンパク質を含む試料中の低分子陰イオンをタンパク質の影響なしに分析できることが分かる。

試料成分が充填剤へ保持される挙動は次のようであると考えられる。

即ち、pH 値 10 の緩衝液の中での分析を考えると、pH 値 10 のときカルボキシル基は解離し負電荷をしており、充填剤細孔内部に存在する 4 級アンモニウム基を解離して正電荷を有している。

example 40 deg C), transport pump 2, injector 3, separation column 4, suppressor 5, and detector 6 are stored up in chassis 10 of analyzer, is many.

constant amount was filled anion which is included in sample which is separated by injector 3 with separation column 4 in ion chromatograph equipment which consists of this kind of constitution, after that, background of electrical conductivity is removed with suppressor 5 above-mentioned way and is detected with rear detector 6.

signal which is detected with detector 6 this way is led by the display equipment 8 (for example recorder) and has reached point where chromatogram is drawn.

anionic exchange resin which it produces aforementioned way as it is filled inside separation column 4, with next kind of experimental condition when it recovered and/or analyzed later mentioned sample next kind of experimental result acquired.

Namely,

When (J2) anionic exchange resin, it was filled in stainless steel chromatography column of internal diameter 5.0 mm, length 100 mm making use of high pressure slurry filling method, measured recovery ratio of protein room in phosphate buffer, it was approximately 95% (albumin).

In addition, recovery ratio with 4.0 mM Na_2CO_3 /4.0 mM NaHCO_3 (As for pH 10.0) approximately was 88%.

(jp2) transfer phase of 4.0 mM Na_2CO_3 /4.0 mM NaHCO_3 (As for pH 10.0) use (As for flow 2.0 ml/min) was done, kind of the temperature 40 deg C, sample injected amount 50 μl , detector 6 of constant temperature tank 9 made ultraviolet absorption detector, could separate Cl^- ion, NO_2^- ion, Br^- ion, NO_3^- ion, SO_4^{2-} ion satisfactorily.

(jp3) description above (jp2) with under identical condition, it measured sample which includes 0.2% albumin, but in this case, Cl^- ion, NO_2^- ion, Br^- ion, NO_3^- ion, SO_4^{2-} ion could be separated satisfactorily.

If from thing above, anionic exchange resin of this invention is used, can analyze the low molecular weight anion in sample which includes protein to influence none of protein understands.

As for behavior which is kept you can think sample component to filler that it seems following way.

Namely, when of analysis in buffer of pH value 10 is thought, at the time of pH value 10 dissociated it does carboxyl group and does negative charge, the dissociated doing quaternary ammonium group which exists in filler capillary internal, it has possessed the positive electric charge.

このような状態の下で、例えば、等電点が5であるようなタンパク質を含む試料を注入した場合の保持挙動を説明すると次のようになる。

即ち、充填剤細孔内部のイオン交換基が4級アンモニウム型であれば、上述のように緩衝液中でも解離して正の電荷を帯びている。

このような充填剤に低分子陰イオンが近づくと、上記陰イオン交換樹脂の表面のポリマー(合成高分子物質)中のカルボキシル基の負の電荷によりイオン排除されるが、細孔内部の陰イオン交換基の正電荷のほうが強いので細孔内部に低分子陰イオンが入りイオン交換吸着される。

また、この充填剤に等電点が緩衝液よりも小さいタンパク質が近づくと、試料タンパク質もまた負の電荷を帯びているため、上記陰イオン交換樹脂の表面の負の電荷によりイオン排除を受ける。

細孔内部の陰イオン交換基の正電荷で引付けられることも考えられるが、タンパク質は分子量が大きく細孔内部には浸透できず、細孔内のイオン交換基とイオン交換吸着できずに溶出されてしまう。

実際には、若干の疎水的吸着があるため、充填剤には若干保持される。

低分子陽イオンの場合は、樹脂表面のポリマー中のカルボキシル基の負の電荷にイオン交換吸着するが、表面の負電荷は極微量であるため濃度の小さい移動相でも簡単に樹脂から脱離してしまう。

試料中にタンパク質と低分子陰イオンが共存している場合は、上記2つの現象が同時におこり、低分子陰イオンだけが充填剤に保持されて分離されるようになる。

以上の現象をまとめると次のようになる。

即ち。

(イ)タンパク質と酵素が共存している場合は、樹脂表面のポリマー中のカルボキシル基の負の電荷との間でイオン排除が起こる。

また、充填剤の細孔には、タンパク質や酵素のサイズが大であるため、浸透できない。

このため、表面の負電荷は極微量であることと相まち、濃度の小さい移動相でも簡単に樹脂から脱離してしまう。

When under this kind of state, for example isoelectric point 5, explains retention behavior when sample which includes kind of protein which is wasfilled, it becomes following way.

Namely, if ion exchange group of filler capillary internal is quaternary ammonium form, above-mentioned way dissociated doing even in buffer, it has positive electric charge.

When low molecular weight anion gets near to this kind of filler, ion it is removed by negative electric charge of carboxyl group in polymer (synthetic polymeric substance) of surface of the above-mentioned anionic exchange resin, but because positive electric charge of anion exchange group of capillary internal is stronger, low molecular weight anion enters into capillary internal and ion exchange is adsorbed.

In addition, when isoelectric point small protein gets near to this filler in comparison with buffer, because it has sample protein and negative electric charge, ion removal is received with negative electric charge of surface of the above-mentioned anionic exchange resin.

With positive electric charge of anion exchange group of capillary internal pulling being attached thought and others, as for protein not be able to permeate the molecular weight largely in capillary internal, ion exchange group and ion exchange inside capillary without adsorbing, it is liquated.

Actually, because there is somewhat hydrophobic adsorption, it is somewhat kept in filler.

In case of low molecular weight cation, ion exchange it adsorbs into negative electric charge of carboxyl group in polymer of resin surface, but negative charge of surface because it is an extremely minute amount, even with transfer phase where concentration is small removal does simply from resin.

When protein and low molecular weight anion have coexisted in sample, the above-mentioned 2 phenomena happen simultaneously, just low molecular weight anion is kept in filler and reaches point where it is separated.

When phenomena above is collected, it becomes following way.

Namely.

When (J2) protein and enzyme has coexisted, ion removal happens between negative electric charge of carboxyl group in polymer of resin surface.

In addition, because size of protein and enzyme is large, it cannot permeate in capillary of filler.

Because of this, negative charge of surface goes hand in hand with the fact that it is an extremely minute amount, even with transfer phase where concentration is small removal does

ら脱離してしまう。

従って、保持力は小さい。

(ロ)低分子陰イオンの場合は、樹脂表面のポリマー中のカルボキシル基の負の電荷との間でイオン排除する。

また、充填剤の細孔に浸透でき、細孔内部では陰イオン交換基との間でイオン交換する。

従って、保持力は大きい。

(ハ)低分子陽イオンの場合は、樹脂表面のポリマー中のカルボキシル基の負の電荷にイオン交換吸着する。

また、充填剤の細孔に浸透できるが、細孔内部ではイオン排除される。

このため、表面の負電荷は極微量であるため濃度の小さい移動相でも簡単に樹脂から脱離してしまう。

従って、保持力は小さい。

以上詳しく説明したような本発明の実施例によれば、クロマト管に充填されタンパク質が共存している試料中の陰イオンを液体クロマトグラフィー手法(イオンクロマトグラフィー手法も含む)を用いて定量分析するのに用いて好適な陰イオン交換樹脂(充填剤)を製造する方法が実現する。

また、このようにして製造された陰イオン交換樹脂は、負電荷をもつ合成高分子で基材の表面を被覆したことで、タンパク質などを含む試料中の低分子陰イオンをタンパク質の影響なしに測定できるという利点がある。

更に、タンパク質などを含む試料を直接注入でき洗浄などの余分な操作を必要としないため、分析条件が簡単で測定時間が大幅に減少するという利点もある。

また、試料中のタンパク質などがカラム充填剤へ吸着することによって起こされるイオン交換容量の見掛け上の減少に起因する保持時間の短縮という問題も無くなり、結果的に再現性に良いクロマトグラムが得られるという利点もある。

更に、試料中のタンパク質などがカラム充填剤へ吸着することなどによるカラム圧力の上昇などに起因するカラム性能の劣化がなくなりカラムの延命化が図れるという利点もある。

simply from resin.

Therefore, gripping force is small.

In case of (jp2) low molecular weight anion, ion it removes between negative electric charge of the carboxyl group in polymer of resin surface.

In addition, be able to permeate to capillary of filler, with the capillary internal ion exchange it does between anion exchange group.

Therefore, gripping force is large.

In case of (jp3) low molecular weight cation, ion exchange it adsorbs into negative electric charge of the carboxyl group in polymer of resin surface.

In addition, it can permeate to capillary of filler, but, with the capillary internal ion it is removed.

Because of this, negative charge of surface because it is a extremely minute amount, even with transfer phase where concentration is small removal does simply from the resin.

Therefore, gripping force is small.

<Effect of Invention>

Above, according to Working Example of kind of this invention which is explained in detail, it is filled in chromatography column and anion in sample where protein has coexisted using in order quantitative analysis to do making use of liquid chromatography technique (Also ion chromatography technique includes.), method which produces preferred anionic exchange resin (filler) actualizes.

In addition, anionic exchange resin which is produced in this way is a benefit that by fact that surface of substrate was covered with synthetic polymer which has negative charge, can measure low molecular weight anion in sample which includes protein etc in influence none of protein.

Furthermore, sample which includes protein etc can directly be filled and because washing or other excessive operation is not needed, analysis condition being simple, there is also a benefit that measurement time decreases greatly.

In addition, protein etc in sample pulling problem, shortening retention time which originates in decrease in regard to appearance of ion exchange capacity which is caused is gone it adsorbs to column packing medicine by, there is also a benefit that chromatogram which is good to the reproducibility in resulting is acquired.

Furthermore, there is also a benefit that protein etc in sample deterioration of column performance which originates in rise etc of the column pressure with fact that etc it adsorbs to column packing medicine and is gone can assure life extension of column.

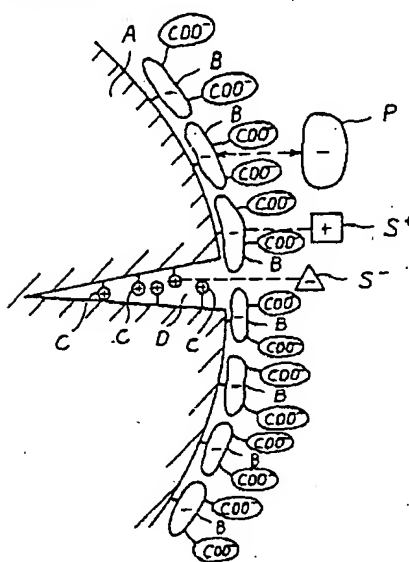
【図面の簡単な説明】

第 1 図は本発明の陰イオン交換樹脂の構成図、第 2 図は本発明の陰イオン交換樹脂の製造方法を説明するための工程説明図、第 3 図は一般的なイオンクロマトグラフ装置の構成説明図である。

A はイオン交換樹脂、B はポリマー、C は陰イオン交換基、P はタンパク質、 S^+ は陽イオン、 S^- は陰イオン。

Drawings

【第 1 図】



- A: 陰イオン交換樹脂
- B: ポリマー
- C: 陰イオン交換基
- D: 細孔
- S^+ : 試料中の陽イオン
- S^- : 試料中の陰イオン
- P: 試料中のタンパク質

【第 2 図】

conversion of column.

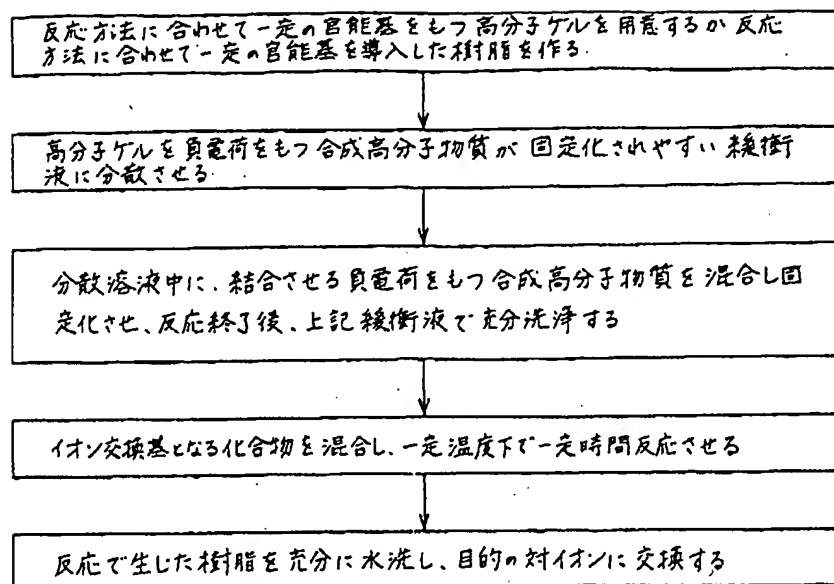
[Brief Explanation of the Drawing(s)]

As for Figure 1 as for configuration diagram, Figure 2 of anionic exchange resin of this invention as for the step explanatory diagram, Figure 3 in order to explain manufacturing method of anionic exchange resin of this invention it is a constitution explanatory diagram of general ion chromatograph equipment.

As for A as for ion-exchange resin, B as for polymer, C as for anion exchange group, P as for protein, S^+ as for cation, S^- anion.

{Figure 1 }

{Figure 2 }



【第3図】

{third figure}

